

SIROLIMUSBEHANDLUNG EINES KINDES MIT PTEN- HAMARTOM-  
TUMOR-SYNDROM

– EIN FALLBERICHT UND IN VITRO STUDIEN –

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von: Gordian Lukas Schmid  
geboren am 23.01.1987 in Leipzig

angefertigt an: Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Medizinische Fakultät, Universität Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. Wieland Kiess  
Dr. rer. nat. Antje Garten  
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Medizinische Fakultät, Universität Leipzig

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 17.11.2015

## **INHALTSVERZEICHNIS:**

<b>INHALTSVERZEICHNIS:</b> .....	<b>1</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>2</b>
<b>BIBLIOGRAPHISCHE BESCHREIBUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>VORBEMERKUNGEN</b> .....	<b>4</b>
<b>EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK</b> .....	<b>5</b>
1. PTEN im biochemischen Kontext .....	5
2. Klinische Bedeutung von PTEN.....	6
3. Gezielte Therapie für PHTS – Beeinflussung der Signalwege.....	7
4. Der Patient M.W. als Ausgangspunkt der Arbeit .....	8
5. Gewinnung von Zellkulturen .....	10
6. IGFBP-2 als Marker für erfolgreiche Sirolimustherapie .....	10
7. Fragestellung.....	11
8. Ergebnisse und Ausblick .....	11
<b>PUBLIKATIONSMANUSKRIFT</b> .....	<b>13</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT</b> .....	<b>21</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>25</b>
<b>ANLAGEN</b> .....	<b>28</b>
I.    Ergänzungsunterlagen zur wissenschaftlichen Publikation.....	28
Supplement 1 - Additional methodological descriptions .....	28
Supplement 2 - Video clip of 3D-MRI reconstruction.....	28
II.   Charakterisierung der Lipom-Zellkulturen.....	29
II.a    Lipom-Zellen in Langzeitkultur .....	29
II.b    Veränderung im PI3K-Signalweg .....	30
III.  Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	32
IV.   Danksagungen .....	33

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

<b>4E-BP1</b>	4E-binding protein 1
<b>AKT</b>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
<b>Array-CGH</b>	Array comparative genomic hybridisation
<b>BMI</b>	Körpermasseindex, Body-Mass-Index
<b>IGF-1</b>	Insulin-like growth factor 1
<b>IGFBP-2</b>	Insulin-like growth factor binding protein 2
<b>IRS1</b>	Insulin-Rezeptor-Substrat-1
<b>LipPD1</b>	Lipom-Zellen mit PTEN-Defizienz
<b>MLPA</b>	Multiplex ligation-dependent probe amplification
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin
<b>mTORC-1/2</b>	mTOR-Komplex 1/2
<b>PHTS</b>	PTEN-Hamartom-Tumor-Syndrom
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinase
<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat
<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
<b>PTEN</b>	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
<b>SGBS</b>	Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom

# **BIBLIOGRAPHISCHE BESCHREIBUNG**

Schmid, Gordian Lukas

Sirolimusbehandlung eines Kindes mit PTEN-Hamartom-Tumor-Syndrom

– Ein Fallbericht und in vitro Studien –

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Medizinische Fakultät, Universität  
Leipzig

Dissertation

33 Seiten, 38 Literaturangaben, 6 Abb., 1 Tab., 4 Anlagen

PTEN ist als Phosphatase an zahlreichen Signalwegen, z.B. von Wachstumsfaktoren beteiligt. Mutationen im *PTEN*-Gen führen zur Entstehung vieler sporadischer Tumore sowie dem kongenitalen PTEN-Hamartom-Tumor-Syndrom (PHTS). Eine kausale Therapie für PHTS steht derzeit nicht zur Verfügung.

Diese Arbeit beschreibt einen experimentellen Sirolimustherapieversuch bei einem Kind mit PHTS, welches sich unter anderem mit Thymushyperplasie, abdomineller Lipomatose und Kachexie präsentierte. Unter Behandlung zeigten sich eine Verbesserung des Allgemeinzustandes und des Größenwachstums des Patienten, sowie eine transiente Verkleinerung des Thymusvolumens. Die massive Lipomatose wurde im Wachstum gehemmt, nahm aber nicht an Volumen ab. Ein erneutes Thymuswachstum nach 19-monatiger Therapie ließ eine Resistenzentwicklung gegen Sirolimus vermuten. Bei Untersuchungen des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges zeigten sich Hinweise für einen möglichen Resistenzmechanismus. Insulin-like growth factor binding protein 2, wird als Biomarker für den Therapieerfolg der Sirolimusbehandlung diskutiert. Dies erwies sich bei unserem Patienten allerdings nicht als geeignet zur Nutzenbewertung der Therapie.

*In vitro* Studien an primären Zellkulturen aus Lipom-Gewebe des Patienten zeigten eine Hemmung von Proliferation und Differenzierung durch Sirolimus, jedoch keine Induktion der Apoptose. Inhibitoren von PI3K und AKT zeigten im Bezug auf Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion stärkere Effekte. Vor allem der AKT-Inhibitor Perifosin könnte für Patienten mit schwerem PHTS als Therapieoption in Betracht gezogen werden.

## VORBEMERKUNGEN

In der vorliegenden Arbeit möchte ich die Ergebnisse meines Promotionsprojektes vorstellen und diskutieren. Dabei sei erwähnt, dass die eingefügte Publikation zwar den Hauptteil meiner Arbeiten repräsentiert, neben der Begleitung und Evaluierung des individuellen Therapieversuches des Patienten mit PTEN-Hamartom-Tumor-Syndrom (PHTS) aber auch ein großer Teil meiner Zeit der Untersuchung einer primären Zellkultur aus Lipomgewebe galt. Die vom gleichen Patienten stammende Lipom-Zellkultur eröffnete die außergewöhnliche Möglichkeit, die pathogenetischen Mechanismen des PHTS und die Wirksamkeit potenzieller Medikamente gegen die Erkrankung *in vitro* zu untersuchen. Da nicht alle Ergebnisse in der eingefügten Publikation beschrieben sind, habe ich im Anhang der Arbeit einige zusätzliche Ausführungen zur Charakteristik der Lipom-Zellen und den Veränderungen der Signalwege, bedingt durch den gefundenen genetischen *PTEN*-Defekt, ergänzt.

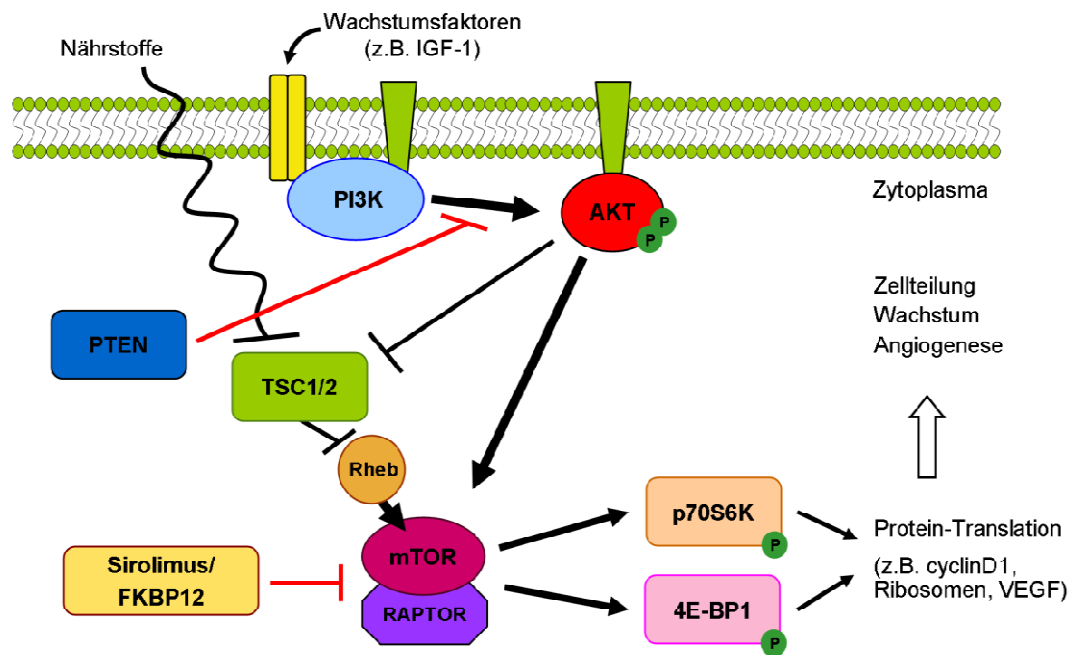
# EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK

## 1. PTEN im biochemischen Kontext

Das *Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10* (PTEN)-Protein ist ein in allen Eukaryoten vorkommendes Enzym, welches vielfältige Funktionen in der Zelle ausführt. Als Phosphatase ist PTEN in der Signaltransduktion von Wachstums- und Apoptosestimuli, im Glukosestoffwechsel, der Zellmigration und einiger anderer Signalwege aktiv (1). Als eine wesentliche Funktion katalysiert PTEN die Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP3) in Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat (PIP2). Damit führt PTEN die gegenläufige Reaktion zur Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aus, welche über die Phosphorylierung von PIP2 zu PIP3 die nachfolgenden Signalkaskaden aktiviert. Besonders betont sei hier die Signalkaskade, die von der PI3K über die AKT (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*; auch als Proteinkinase B bezeichnet) und das *mammalian target of rapamycin* (mTOR) wirksam ist. Das mTOR Protein kann mittels zweier verschiedener Komplexe, dem mTOR-Komplex 1 (mTORC-1) und dem mTOR-Komplex 2 (mTORC-2) mit einer Vielzahl von Partnerproteinen und verschiedenen Substraten in der Zelle interagieren und wirksam werden (2,3). Eine verminderte PTEN-Funktion bewirkt über eine erhöhte PIP3-Konzentrationen eine Phosphorylierung der AKT und nachfolgend eine vermehrte Aktivierung des mTORC-1 (4) (siehe Abb. 1). Der mTORC-1 vermittelt wiederum über seine Substrate, vor allem der S6-Kinase und dem *4E-binding protein 1* (4E-BP1) wesentliche Funktionen des PI3K/AKT/mTOR Signalweges, wie z.B. Proliferation, Adhäsion, Migration, Überleben und Angiogenese (5).

Wachstumsstimuli durch endokrine Wachstumsfaktoren werden durch PTEN in ihrem Ausmaß reguliert (1). Ein funktioneller Mangel an PTEN-Protein führt in der Zelle zu einem Übergewicht von PIP3 und somit zu einer Überaktivierung der Wachstumsfaktor-Signalwege ohne adäquaten Stimulus. Damit ist PTEN als Tumorsuppressor einzustufen, welcher bei Funktionsverlust eine Entartung der betroffenen Zellen begünstigt. Auf die klinische Bedeutung eines Mangels an PTEN soll im nachfolgenden Kapitel eingegangen werden.

Neben der bedeutsamen Funktion als Regulator von Proliferation und Apoptose wurden in den letzten Jahren vielfältige andere Wirkungen von PTEN in der Zelle entdeckt. So wurde gezeigt, dass PTEN sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär die DNA-Reparatur begünstigt. Außerdem konnte eine chromosomale Stabilisierung durch direkte Interaktion der C2-Domäne des PTEN-Protein mit dem Zentromer gezeigt werden (6).



**Abb. 1: Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg**

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ist hier als Übersicht mit einigen Regulationsmechanismen und den Wirkungen von PTEN und Sirolimus dargestellt. Pfeile zeigen Aktivierung an, Balken Inhibition. (FKBP12 = FK506 binding protein, mTOR/Raptor = mTORC-1, Rheb = Ras homolog enriched in brain, TSC1/2 = Komplex aus den Tuberöse Sklerose Proteinen 1 und 2).

## 2. Klinische Bedeutung von PTEN

In der Onkologie rückte PTEN als Tumorsuppressor in den vergangenen Jahrzehnten zunehmend in den Fokus der Wissenschaft (7). Eine Verminderung der PTEN-Expression, zB. durch Mutationen im *PTEN*-Gen konnte in verschiedensten Tumoren aller Organsysteme (4,8), vor allem jedoch in Glioblastomen, Endometriums- und Prostatakarzinomen nachgewiesen werden. YIN und SHEN bezeichneten PTEN als den am zweithäufigsten mutierten Tumorsuppressor in sporadischen Krebserkrankungen nach p53 (6). Bei einem Funktionsverlust begünstigt der pathologisch erhöhte PIP3-Spiegel die übermäßige Proliferation und das Überleben der Tumorzellen (9).

Neben diesen sporadisch auftretenden Krebserkrankungen konnte auch eine Gruppe hereditärer Erkrankungen mit heterozygoten Keimbahnmutationen im *PTEN*-Gen assoziiert werden. Diese Gruppe, bestehend aus dem Cowden-Syndrom, dem Bannayan-Riley-Ruvalcaba-Syndrom, dem Proteus-Syndrom und dem Proteus-like-Syndrom, wird als PHTS zusammengefasst (10–12). Die Ausprägung dieser Erkrankung ist hoch variabel und reicht von Hauterscheinungen, die erst im Erwachsenenalter auftreten (13) bis hin zu schweren

Phänotypen des Proteus-Syndroms mit asymmetrischem Überwuchs (14) oder lebensgefährlichen Verläufen im Kindes- und Jugendalter (15). Typische Symptome des PHTS sind unter anderem die namensgebenden Hamartome, Makrozephalie, Gefäßmalformationen, Naevi, typische sprenkelartige Hyperpigmentationen am Penis, asymmetrischer Überwuchs, Lipomatosen und Trichilemmome (16). Neben diesen, in der Mehrzahl der Fälle nicht lebensbedrohlichen Symptomen leiden Patienten mit PHTS vor allem an dem deutlich erhöhten Risiko für Brust-, Schilddrüsen-, Endometrium-, Nieren- und kolorektale Karzinome, sowie für Melanome (17). Die Prävalenz des PHTS ist unklar. NELEN et al. schätzten die Prävalenz für das Cowden-Syndrom auf 1/200.000 bis 1/250.000 für die niederländische Bevölkerung (18). Da das Cowden-Syndrom aber im klinischen Alltag häufig nicht richtig diagnostiziert wird, dürfte diese Zahl die wirkliche Prävalenz unterschätzen (16). Trotzdem ist das PHTS mit einer Prävalenz von unter 5/10.000 Einwohnern (19) als eine seltene Erkrankung einzuordnen.

### **3. Gezielte Therapie für PHTS – Beeinflussung der Signalwege**

Derzeitig besteht die Therapie des PHTS nur aus engmaschiger Überwachung von Neoplasien, genetischer Beratung und symptomatischen chirurgischen Eingriffen (20). Seit der Identifikation des *PTEN*-Gens als Auslöser für die unter dem Begriff PHTS subsumierten Syndrome wurden kausale Therapieansätze mit einem Eingriff in die überaktivierten Signalkaskaden vorgeschlagen, um die Tumorfrequenz präventiv zu senken und vorhandenes Tumorwachstum zu verringern.

Tatsächlich wurde im Mausmodell mit heterozygotem *PTEN*-Knockout gezeigt, dass die im Modell sehr große Tumorfrequenz durch Sirolimus oder analoge Substanzen stark vermindert werden konnte (4). Die vor allem für Tumoren des Fettgewebes relevanten *in vitro* Untersuchungen von BELL et al. (21) konnten des Weiteren zeigen, dass durch Sirolimus die terminale Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten blockiert wird. Als Mechanismus hierfür wird die Beeinflussung des Hauptregulators der Adipogenese, PPAR $\gamma$ , durch die Gruppe der 4E-Bindungsproteine (4EBPs) vermutet, welche wiederum mTORC-1 Substrate sind (22).

THOMAS N. DARLING empfahl 2006 den Einsatz von mTOR-Inhibitoren für die Gruppe der Hamartom-Syndrome, aus der er unter anderen das Cowden-Syndrom, die Tuberöse Sklerose, die Neurofibromatose Typ 1 und das Peutz-Jegher-Syndrom hervorhob (23). Diese Erkrankungen ähneln sich im Phänotyp und beruhen auf verschiedenen Mutationen in Genen



von Proteinen, die in ihrer Funktion konvergent dem mTOR-Signalweg vorgeschaltet sind. Aus dieser gemeinsamen Endstrecke im Mechanismus der Krankheitsentstehung leitet DARLING die Rationale zur Inhibition des mTOR Komplexes 1 (mTORC-1) durch Sirolimus oder analoge Substanzen ab. Seitdem wurden Fallberichte, Fallserien und kleine Studien zum Einsatz von Sirolimus und analoger Substanzen bei Tuberöser Sklerose veröffentlicht. Es konnte gezeigt werden, dass bei Tuberöser Sklerose mit Sirolimus eine Größenabnahme sowohl von Astrozytomen (24–26), von Angiomyolipomen (27,28) als auch von kutanen Angiofibromen (29) erzielt werden konnte. Die Autoren berichteten außerdem, dass die mTORC1-Inhibitoren in ihrem Einsatz an insgesamt 80 Patienten sicher und nebenwirkungsarm gewesen seien.

Im Jahr 2008 veröffentlichten MARSH et al. den ersten Bericht über die Sirolimusbehandlung eines Kindes mit *PTEN*-Keimbahnmutation (15). Klinisch standen die mediastinalen und abdominellen Tumoren mit Atembehinderung und obstruktiven Störungen bei der Nahrungsaufnahme, die Hypalbuminämie, die Wachstumsverzögerung und die multiplen Lipome im Mittelpunkt. Sirolimus führte zu einer Verkleinerung der mediastinalen und abdominellen Tumore und einer deutlichen Besserung von Atemnot und Marasmus des Patienten.

Ein weiter Fall von Sirolimusbehandlung bei PHTS wurde 2011 von IACOBAS et al. veröffentlicht (30). Dabei standen arteriovenöse Gefäßmalformationen und zunehmender Funktionsverlust des rechten Unterarms im Vordergrund. Auch hier zeigte sich unter oraler Sirolimustherapie eine klare Verbesserung der Symptomatik bei geringen Nebenwirkungen.

#### **4. Der Patient M.W. als Ausgangspunkt der Arbeit**

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist ein Patient, welcher im Alter von 11 Monaten an die Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin in Leipzig zur Diagnosefindung überwiesen wurde. Der Junge wurde als drittes Kind gesunder, nicht verwandter Eltern ohne relevante Familienanamnese geboren. Bei Geburt zeigte er sich als gesundes Kind (APGAR Punktwert nach 5 und 10 min: 10, 10; Körperlänge 55 cm, >90. Perzentile; Gewicht 3900 g, >85. Perzentile; Kopfumfang 39 cm >97. Perzentile). Neben der leichten Makrozephalie wurden weitere leichte Dysmorphiezeichen (Vierfingerfurche, hyperpigmentierte Flecke im Sakralbereich und auf der Glans penis, Hypertelorismus, ein Hämangiom an der Unterlippe, leichte Trichterbrust) beobachtet.

Ab dem 6. Lebensmonat litt der Patient unter wiederholter Atemnot, Schluckbeschwerden und rezidivierenden Infekten der oberen Atemwege. Daraufhin wurde mittels Computertomographie und Biopsie eine benigne Hyperplasie des Thymus und der Rachen- und Gaumenmandeln festgestellt. Eine Hyperplasie des lymphatischen Gewebes in der Mukosa von Magen, Duodenum und Kolon konnte im späteren Verlauf endoskopisch nachgewiesen werden (31).

Der klinische Zustand des Patienten verschlechterte sich zunehmend. Im Alter von drei Jahren führten unzureichende Gewichtszunahme und vermindertes Größenwachstum zu einer Kachexie mit dem vollständigen Verlust von subkutanem Fettgewebe.

Schon im Alter von 7 Monaten wurde bei dem Jungen in der Bildgebung eine große retroperitoneale Raumforderung festgestellt. Diese wurde histologisch als Lipomatose identifiziert und zeigte im Verlauf ein progredientes Wachstum mit der Verlagerung und Einengung der intraperitonealen Organe nach vorn. Die Lipomatose war wegen der Umwachsung vieler retroperitonealer Organe und Strukturen (Nieren, Ureter, Nerven, Blutgefäße) nicht chirurgisch zu entfernen und wuchs in ihrer Ausdehnung durch das kleine Becken hindurch bis zum Steißbein. Die gesamte paraspinale Rückenmuskulatur wurde mit Fett durchsetzt. Des Weiteren zeigten sich solitäre Lipome am Hals und an der linken Flanke des Patienten und intraspinal auf Höhe des achten Brustwirbelkörpers mit Ausdünnung des Myelons.

Genetische Untersuchungen mittels *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) konnten eine heterozygote Deletion von Exon 2 bis 9 / 9 im *PTEN*-Gen in Blutzellen, in Haut-Fibroblasten und in den Zellkulturen von Lipom-Zellen des Patienten nachweisen. Das zweite Allel zeigte bei einer Sequenzierung keine Auffälligkeiten. Eine Array-CGH (*Comparative Genomic Hybridisation*)-Analyse konnte die Deletion auf einen Bereich von etwa 152.000 bp (von Intron 1-2 bis etwa 53.000 bp nach dem *PTEN*-Gen) eingrenzen. Die Testung der Eltern und Geschwister auf Deletionen im *PTEN*-Gen verlief ohne pathologische Befunde. Mit Hilfe der genetischen Ergebnisse war es möglich, das Krankheitsbild des Patienten dem PHTS, speziell dem Bannayan-Riley-Ruvalcaba-Syndrom, zuzuordnen.

Die schwere Kachexie und die progressive Lipomatose machten ein therapeutisches Handeln im Alter von vier Jahren notwendig. Wegen des schlechten Allgemeinzustandes des Kindes und der Inoperabilität der Lipomatose kamen weder Chemotherapie noch chirurgische Tumorreduktion in Frage. Aufgrund der plausiblen Rationale der mTOR-Inhibition bei funktionellem PTEN-Mangel, der positiven Erfahrungen der Arbeitsgruppe von DEBORAH

MARSH mit Sirolimustherapie bei PHTS (15) und den Berichten vom Sirolimus-Einsatz bei Tuberöser Sklerose erschien diese Behandlungsoption als vertretbar und hilfreich. Gemeinsam mit den Eltern und in Übereinstimmung mit der klinischen Ethikkommission entschieden wir uns für eine experimentelle orale Sirolimusbehandlung des Kindes.

## **5. Gewinnung von Zellkulturen**

Im Rahmen der histologischen Abklärung der Tumorentitäten wurden dem genannten Patienten ein subkutanes Lipom an der linken Flanke und verschiedene Proben der retroperitonealen Lipomatose reseziert. Histologisch zeigten sich sowohl das Lipom als auch die Lipomatose als gutartiges Gewebe, welches zu etwa 80 % aus typischen Siegelring-Zellen bestand. Einen atypischen Befund stellten die eingestreuten Inseln von multivakuolären Fettzellen dar, die am ehesten an braunes Fettgewebe erinnerten.

Mit Einverständnis der Eltern wurden aus den nativen Gewebeproben, die nicht für diagnostische Zwecke benötigt wurden, primäre Zellkulturen, wie im Publikationsmanuskript beschrieben, gewonnen. Es gelang, fibroblastenartige Zellen zu isolieren, welche sich nach bestehenden Protokollen (32) zu fettakkumulierenden Adipozyten differenzieren ließen.

## **6. IGFBP-2 als Marker für erfolgreiche Sirolimustherapie**

*Insulin-like growth factor 1* (IGF-1) spielt eine zentrale Rolle als Wachstumsfaktor für das kindliche Wachstum, den Metabolismus und zahlreiche andere Prozesse im menschlichen Körper. Von den sechs bekannten Bindungsproteinen kommt dem *Insulin-like growth factor binding protein 2* (IGFBP-2) im Zusammenhang mit Übergewicht und kindlicher metabolischer Entwicklung eine besondere Bedeutung zu (33). Neben der Beeinflussung der IGF-1 Verfügbarkeit werden auch IGF-1 unabhängige Funktionen im Metabolismus diskutiert (33).

IGFBP-2 ist das wichtigste Bindungsprotein, das von Adipozyten während der Differenzierung ausgeschüttet wird. Außerdem konnte eine Assoziation der IGFBP-2-Serumspiegel mit der Insulinsensitivität gezeigt werden (34). Eine negative Korrelation der Serumspiegel mit dem Körpermasseindex (BMI) wurde unter anderem von CROWE et al. gezeigt (35).

Des Weiteren wurden erhöhte IGFBP-2 Spiegel sowohl bei extremen klinischen Zuständen wie Schock, Unterernährung und Sauerstoffmangel, als auch bei einer großen Anzahl von bösartigen Neoplasien beobachtet (36,37).

MARSH et al. postulierten, dass der IGFBP-2-Serumspiegel geeignet sei, um den Therapieerfolg von Sirolimus bei Patienten mit PTEN-Mutation zu überprüfen (15). Dabei wurden 5 Messwerte angeführt, von denen die Messungen vor Therapiebeginn und während einer Behandlungspause höhere IGFBP-2-Konzentrationen ergaben als unter Therapie. Zur Überprüfung dieser These wurden bei dem von uns untersuchten Patienten regelmäßig die IGFBP-2-Serumspiegel gemessen.

## **7. Fragestellung**

Die etablierten Therapieansätze für das PHTS bestehen derzeit lediglich in regelmäßiger Untersuchung von Neoplasien, genetischer Beratung und symptomatischen chirurgischen Eingriffen. Die weitere Untersuchung von medikamentösen Strategien zur Symptomkontrolle erscheint im Kontext der vorhandenen Fallberichte und Fallserien als nötig und aussichtsreich.

Im Rahmen der experimentellen Sirolimusbehandlung und der Möglichkeit, vom Patienten stammende Zellkulturen zu untersuchen, ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Kann Sirolimus die Symptome des Patienten mit PHTS verbessern und das Volumen der Lipomatose und der Thymushyperplasie verringern?
2. Kann Sirolimus in Lipom-Zellen die Proliferation und die adipozytäre Differenzierung hemmen und Apoptose induzieren?
3. Welchen Einfluss auf Proliferation und Apoptose zeigen andere Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR Signalweges?
4. Ist der IGFBP-2 Serumspiegel ein geeigneter Biomarker für die Erfolgskontrolle einer Sirolimustherapie bei PHTS?

## **8. Ergebnisse und Ausblick**

Die Sirolimusbehandlung bewirkte eine deutliche Verbesserung der klinischen Symptomatik und Hemmung des Thymuswachstums des Patienten. Das Thymusvolumen nahm allerdings am Ende der Behandlungsperiode von 19 Monaten erneut zu. *In vitro* verursachte Sirolimus eine Verringerung von Wachstum und Differenzierung der Lipom-Zellen, konnte aber keine Apoptose induzieren. Von den weiteren getesteten Inhibitoren zeigte vor allem der AKT-Inhibitor Perifosin eine starke Wachstumsminde- rung und Apoptoseinduktion. Der IGFBP-2

Serumsspiegel erwies sich im aktuellen Fall nicht als geeigneter Biomarker zur Erfolgskontrolle der Therapie.

Wegen der sehr kleinen Prävalenz des PHTS sind Fallberichte und experimentelle Therapiestudien ein wesentlicher Bestandteil zur Verbesserung der klinischen Versorgung von Patienten, die unter schweren Verlaufsformen leiden. Zur Verbesserung der Aussagekraft von klinischen Studien erscheint es sinnvoll, mit überregionalen Forschungsverbänden die wenigen Patienten und klinischen Erfahrungen mit deren Behandlung zu bündeln. Die *in vitro* Testung weiterer möglicher Substanzen zur Behandlung des PHTS kann richtungsweisend für künftige klinische Untersuchungen sein.

Außergewöhnlich an diesem Projekt ist die Möglichkeit der simultanen Untersuchung der Effekte von einem Medikament auf den klinischen Zustand des Patienten und auf ein natürliches Zellmodell mit identischer Mutation. Die Gewinnung von Zellmodellen aus resezierten Tumorgeweben erscheint als ein nützliches Prinzip in der Erforschung neuer Therapieansätze, wenngleich die limitierte Aussagekraft von Zellkulturversuchen und die ethische Vertretbarkeit experimenteller Therapiestudien dabei nicht aus dem Fokus geraten dürfen.

Die Ergebnisse der beschriebenen Fragestellungen wurden in der nachfolgenden wissenschaftlichen Publikation veröffentlicht.

# Sirolimus treatment of severe PTEN hamartoma tumor syndrome: case report and *in vitro* studies

Gordian L. Schmid<sup>1,2</sup>, Franziska Kässner<sup>1</sup>, Holm H. Uhlig<sup>3</sup>, Antje Körner<sup>1,2</sup>, Jürgen Kratzsch<sup>4</sup>, Norman Händel<sup>1</sup>, Fred-P. Zepp<sup>5</sup>, Frank Kowalzik<sup>6</sup>, Andreas Laner<sup>6</sup>, Sven Starke<sup>1</sup>, Franziska K. Wilhelm<sup>1,2</sup>, Susanne Schuster<sup>1</sup>, Adrian Viehweger<sup>7</sup>, Wolfgang Hirsch<sup>7</sup>, Wieland Kiess<sup>1</sup> and Antje Garten<sup>1</sup>

**BACKGROUND:** Phosphatase and tensin homolog (PTEN) hamartoma tumor syndrome (PHTS) is caused by germ line mutations in the *PTEN* gene. Symptoms include cancer predisposition, immune deviations, and lipomas/lipomatosis. No causal standard therapy is available. We describe a therapeutic attempt with the mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor sirolimus for a PHTS patient suffering from thymus hyperplasia and lipomatosis. We furthermore assessed the *in vitro* effects of sirolimus and other inhibitors on lipoma cells of the patient.

**METHODS:** The patient underwent clinical and blood examinations and whole-body magnetic resonance imaging to assess tumor sizes. Lipoma cells of the patient were incubated with inhibitors of the phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/AKT/mTOR signaling pathway to analyze the effects on proliferation, adipocyte differentiation, and survival *in vitro*.

**RESULTS:** Sirolimus treatment improved somatic growth and reduced thymus volume. These effects diminished over the treatment period of 19 mo. Sirolimus decreased lipoma cell proliferation and adipocyte differentiation *in vitro* but did not cause apoptosis. PI3K and AKT inhibitors induced apoptosis significantly.

**CONCLUSION:** Sirolimus treatment led to an improvement of the patient's clinical status and a transient reduction of the thymus. Our *in vitro* findings point to PI3K and AKT inhibitors as potential treatment options for patients with severe forms of PHTS.

tumors, intestinal polyposis, vascular malformations, and lipomas and have an increased life-time risk for breast, thyroid, and endometrial cancers (3,4). The first reported successful treatment attempt with the mTOR complex 1 (mTORC-1) inhibitor sirolimus for a patient with PHTS described a reduction of tumor masses and improvement of the patient's general state (5). More recently, an experimental oral sirolimus treatment of vascular malformation in a patient with PHTS, subtype Bannayan–Riley–Ruvalcaba Syndrome, was reported (6). We here describe the case of a child with an extreme phenotype of PHTS, including lipomatosis and severe cachexia. An individualized sirolimus treatment resulted in an improvement of the patient's symptoms. *In vitro* findings supported the treatment efficacy. However, after 19 mo of treatment, tumor growth accelerated again, indicating adaptation of tumor cells to mTORC-1 inhibition.

## RESULTS

### Clinical Findings

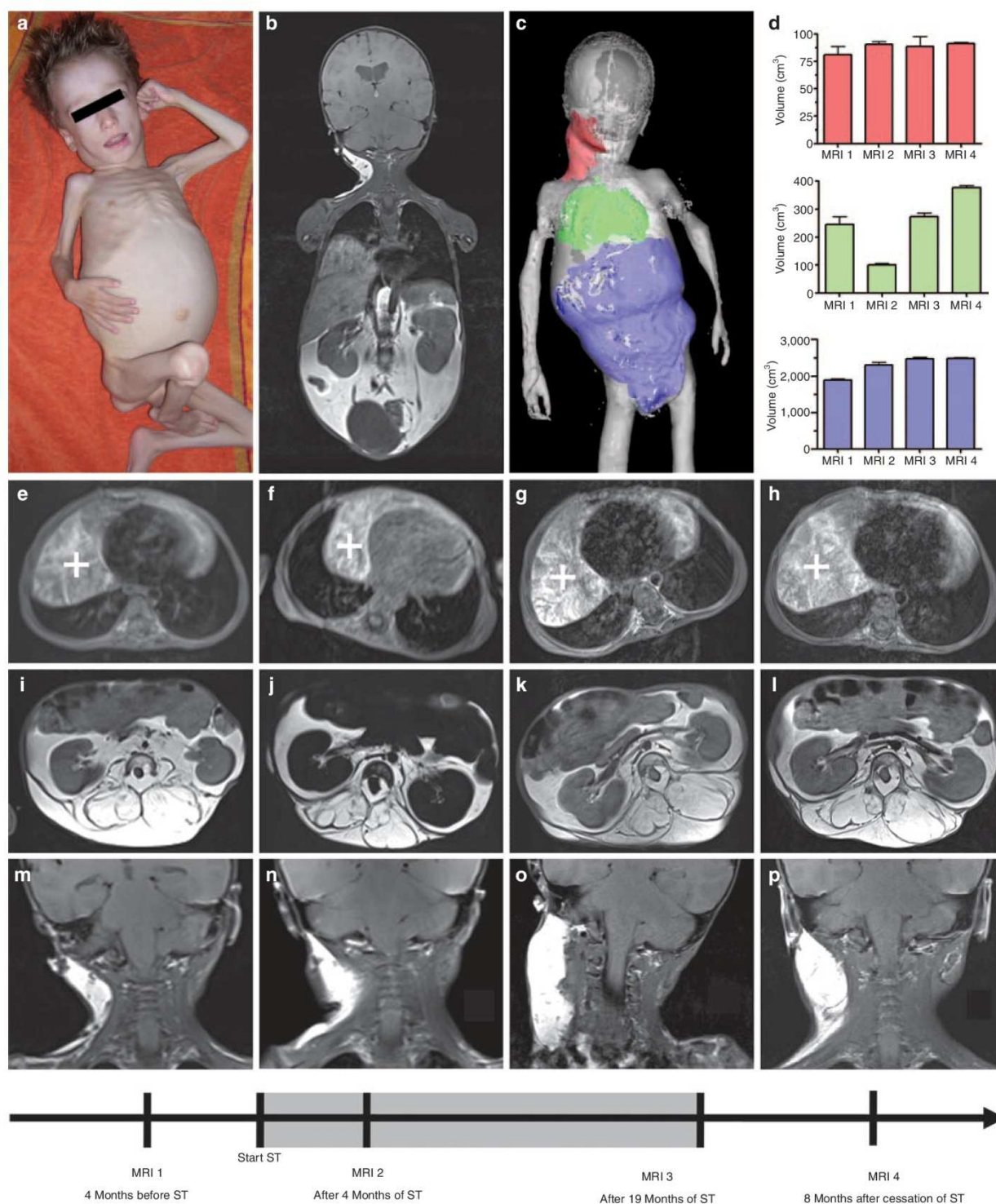
The patient was born as the third child of nonconsanguineous parents without a relevant family history. After birth, the patient presented as a healthy child (length: 55 cm, >90th percentile; weight: 3,900 g, >85th percentile; and head circumference: 39 cm, >97th percentile). However, the patient's state worsened into severe cachexia, with complete loss of subcutaneous adipose tissue (Figure 1a,b). A fasting glucose level of 1.9 mmol/l (35 mg/dl; reference: 3.6–5.6 mmol/l) was detected at the age of 42 mo. Attempts of oral hypercaloric nutrition failed. Parents refused nasogastric feeding. The patient's growth rate slowed down to a complete growth arrest in his fourth year (Figure 2d,e). At the age of 6 mo, he presented with dysphagia and episodes of shortness of breath due to hyperplastic tonsils and an enlarged thymus. The thymus was histologically characterized by lymphoid hyperplasia with large fractions of fatty streaks. A colonoscopy revealed an intestinal lymphoid hyperplasia (7). Furthermore, abdominal lipomatosis, fatty infiltrations of the back muscles and the upper leg, and multiple solitary lipomas were observed. Histology

Phosphatase and tensin homolog (PTEN) dephosphorylates phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate in the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. Germ line mutations in *PTEN* cause disorders, variable in severity and progression of symptoms—summarized as *PTEN* hamartoma tumor syndrome (PHTS) (1). The true prevalence is unknown but is estimated to be 1 in 200,000–250,000 (2) for Cowden syndrome, a subtype of PHTS. Patients develop hamartomatous

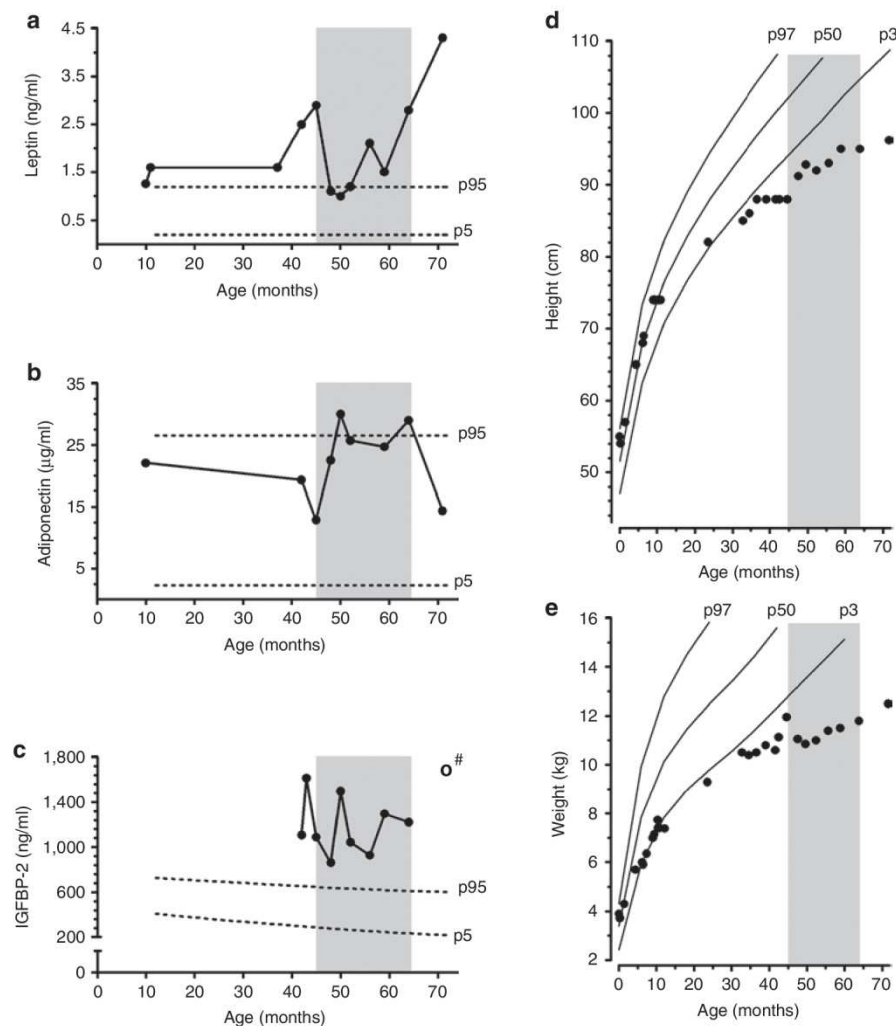
<sup>1</sup>Hospital for Children & Adolescents, Department of Women and Child Health, Center for Pediatric Research Leipzig, University of Leipzig, Leipzig, Germany; <sup>2</sup>Leipzig University Medical Center, IFB Adiposity Diseases, Leipzig, Germany; <sup>3</sup>John Radcliffe Hospital, Translational Gastroenterology Unit and Children's Hospital, Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford, Oxford, UK; <sup>4</sup>Institute of Laboratory Medicine, Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, University of Leipzig, Leipzig, Germany; <sup>5</sup>Department of Paediatrics, University Medical Center, Johannes Gutenberg-University Mainz, Mainz, Germany; <sup>6</sup>Medical Genetics Center, Munich, Germany; <sup>7</sup>Department of Paediatric Radiology, University of Leipzig, Leipzig, Germany. Correspondence: Antje Garten (antje.garten@medizin.uni-leipzig.de)

Received 25 April 2013; accepted 14 September 2013; advance online publication 22 January 2014. doi:10.1038/pr.2013.246





**Figure 1.** Clinical presentation of a boy with phosphatase and tensin homolog hamartoma tumor syndrome (PHTS). (a) The photograph shows the patient at the age of 3 years with cachexia and the protruded abdomen. (b) Retroperitoneal fat masses are apparent in the magnetic resonance imaging (MRI). (c) Regions of interest of the lipoma at the neck (red), the hyperplastic thymus (green), and the abdominal lipomatosis (blue) were marked in a three-dimensional reconstruction of an MRI and (d) quantified as shown in the graphs to monitor tumor growth. (e–h) The enlarged thymus (marked with a white plus) shrank during the first 4 mo of sirolimus treatment (ST) and increased in size after 19 mo and further after cessation of therapy. (i–l) The abdominal lipomatosis did not decrease in size until the 19th mo of sirolimus therapy. (m–p) The solitary lipomas, e.g., at the right neck, did not change in volume. The shaded area on the time line indicates the duration of sirolimus treatment. Parental consent to publish this photograph was obtained by the authors.



**Figure 2.** Serum markers and growth charts. (a–c) Serum levels of leptin, adiponectin, and insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-2 were measured before, during, and after sirolimus treatment. The dotted lines indicate the reference intervals. (d,e) Growth charts show the stagnated weight and the catch-up growth after initiation of sirolimus therapy. The patient's weight increased slightly during treatment. p3, 3rd percentile; p5, 5th percentile; p95, 95th percentile; p97, 97th percentile. \*The open circle indicates a measurement with a concentration higher than the detectable limit, >1,680 ng/ml; the shaded areas indicate the duration of sirolimus treatment.

revealed that the benign fatty tumors were composed of about 80% white adipocytes with insular spots of multilocular cells, appearing as brown adipocytes. Subsequently, the tumors grew progressively, and additional lipomatous swellings under the skin appeared. Volumes of the tumor masses at the age of 42 mo are illustrated in the three-dimensional reconstruction of a magnetic resonance image (Figure 1c,d and Supplementary Video S1 online).

Sanger sequencing of *PTEN* revealed no point mutations in the exons and flanking regions. However, a large heterozygous *PTEN* deletion of the exons 2–9 of the nine exons was discovered in the patient's peripheral blood cells, cultured fibroblasts, and cultured lipoma cells using multiplex ligation-dependent probe amplification. The parents and siblings tested negative for the deletion. Further investigations via microarray-based

comparative genomic hybridization revealed the deletion to be located between positions chr10:89,629,799 bp and chr10:89,781,899 bp. Exons 2–9 of the *PTEN* gene and about 53,400 bp downstream of the *PTEN* gene were found to be deleted.

#### Effects of Sirolimus Treatment

The abdominal lipomatosis led increasingly to severe compromise of mobility and breathing. Surgical lipoma reduction and chemotherapy were not justified due to the clinical state of the child. Given the published case of successful sirolimus treatment for Proteus syndrome (5), the known dose and safety profile, and the plausible mechanism of blocking being increased PI3K signaling downstream of *PTEN*, an individualized therapy attempt with sirolimus was initiated at the age



of 46 mo. The patient received a daily oral sirolimus dose of 0.1 mg/kg body weight. Aimed serum levels (5–10 ng/ml) were reached and monitored at regular intervals.

After 4 wk of sirolimus therapy without side effects, the parents reported subjective improvement of physical and mental activity. Although serum levels of human insulin-like growth factor (IGF)-I (20.8, 14.1–34.3, and –3.33 µg/l (median, range, and mean SD score, respectively) and IGF-binding protein (IGFBP)-3 (0.32, 0.22–0.56, –8.27 µg/l) remained lower than age-matched reference values before and during sirolimus therapy, a catch-up growth of 4.8 cm ( $\pm 0.57$  SD score) was determined during the first 4 mo of therapy (Figure 2d). After 1 y of treatment, the patient was able to walk and to attend kindergarten. However, the catch-up growth slowed down. A whole-body magnetic resonance imaging conducted after 4 mo of treatment revealed a regression of the thymus (7). We measured a reduction of thymus size from 246 to 99 cm<sup>3</sup>. The changes in the subsets of blood lymphocytes under therapy were reported earlier (7). Another whole-body magnetic resonance imaging (MRI) after 19 mo of sirolimus therapy showed recurrent growth of the thymus up to the size before therapy (273 cm<sup>3</sup>; Figure 1e–g). The intestinal mucosa-associated lymphatic tissue hyperplasia improved under therapy. The growth of the abdominal lipomatosis was attenuated when comparing the 4-mo period before and after initiation of sirolimus therapy (MRI1  $\rightarrow$  MRI2, from 1,901 to 2,311 cm<sup>3</sup>;  $\Delta 410$  cm<sup>3</sup>) with the last 15 mo of treatment (MRI2  $\rightarrow$  MRI3, from 2,311 to 2,471 cm<sup>3</sup>;  $\Delta 160$  cm<sup>3</sup>, Figure 1i–k). The lipoma at the neck showed no significant changes in volume over the observed time course (Figure 1d,m–p). The lack of subcutaneous adipose tissue of the patient persisted, and body weight slightly increased by only 750 g. Sirolimus administration was stopped after 19 mo due to the absence of clinical benefit. Another MRI was conducted 8 mo after cessation of the sirolimus treatment. The thymus volume increased further up to 376 cm<sup>3</sup> (Figure 1d,h), but no further growth of the abdominal lipomatosis was found (Figure 1d,i).

Leptin and adiponectin serum levels were measured during sirolimus treatment. Interestingly, the high leptin levels decreased from 2.9 to 1.1 ng/ml (reference: 0.2–1.19 µg/l, 5th–95th percentile range) after the start of therapy but increased subsequently up to values measured initially—and greater—after treatment cessation (Figure 2a). Adiponectin levels increased under sirolimus treatment and persisted at median values of 25.7 (range: 22.5–30.0 µg/ml) within the upper range of the reference interval (2.33–26.50 µg/ml, 5th–95th percentile range). After cessation of sirolimus treatment, the values decreased to initial levels (Figure 2b). IGFBP-2 has been proposed as a diagnostic marker for the success of sirolimus therapy (5). To verify this, IGFBP-2 concentrations were measured in serum samples taken at every consultation of the patient. IGFBP-2 levels were highly variable and elevated compared with reference values (277–640 ng/ml, 5th–95th percentile range). However, no statistically significant difference between the concentrations before and under sirolimus therapy was found (Figure 2c).

#### Effects of Sirolimus *In Vitro*

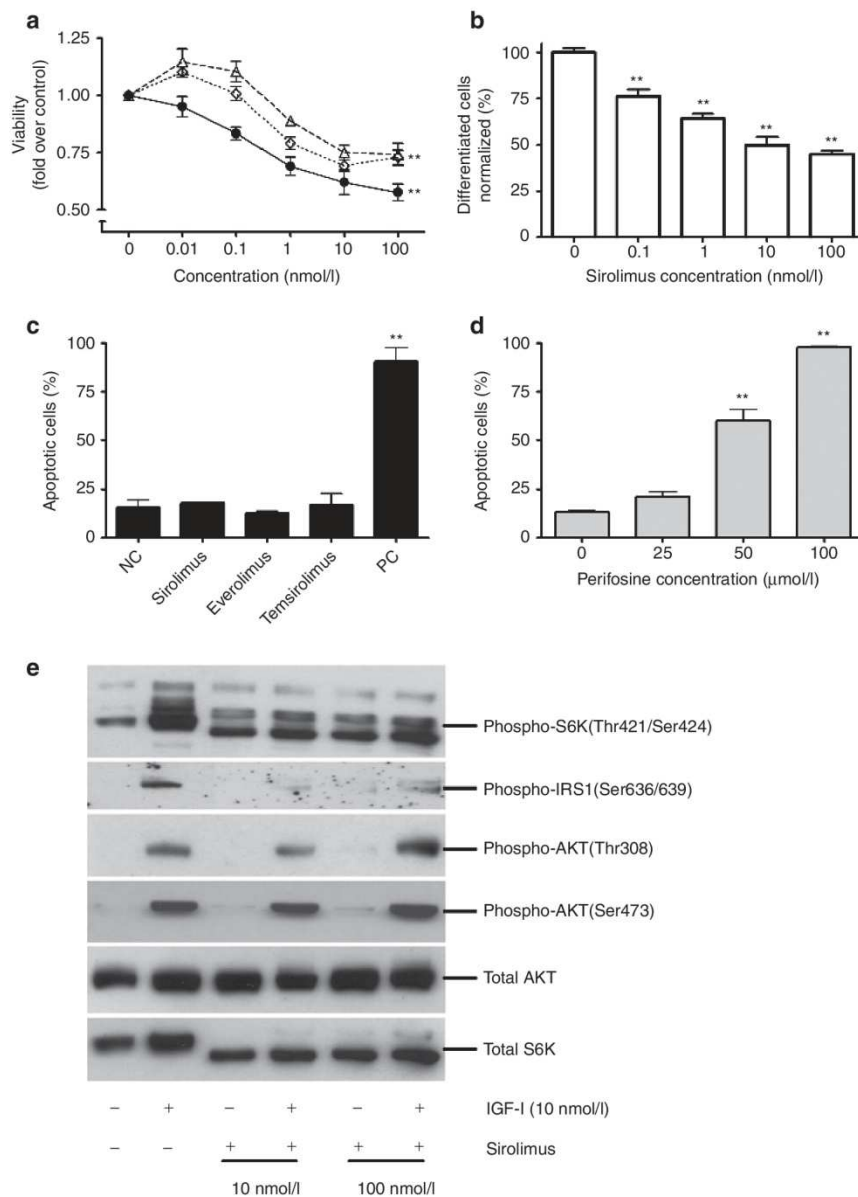
We tested the effects of sirolimus, everolimus, and temsirolimus on proliferation, apoptosis, and terminal adipose differentiation of lipoma cells *in vitro*. Viability assays revealed a  $42.5 \pm 3.7\%$  decrease of viability after 96 h of sirolimus treatment (100 nmol/l). Everolimus and temsirolimus showed lower effects at equimolar concentrations (Figure 3a). Furthermore, sirolimus caused a significant inhibition of adipose differentiation by  $56.4 \pm 9.1\%$  ( $P < 0.01$ ) at 100 nmol/l (Figure 3b). We found no evidence for an apoptotic/cytotoxic effect of sirolimus (Figure 3c) or its analogues (Table 1). Western blots revealed a decreased phosphorylation of the mTORC-1 target p70S6 kinase (p70S6K) after 48 h of sirolimus preincubation followed by stimulation with IGF-I. Under the same conditions, decreased levels of phospho(S636/639) insulin receptor substrate 1 (IRS1) and increased levels of phospho(S473 and T308) AKT were observed (Figure 3e), indicating that the feedback inhibition of AKT mediated by mTORC-1, p70S6K, and IRS1 was attenuated by sirolimus (8).

#### Other Inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR Pathway

Because preferential mTORC-1 inhibitors did not induce apoptosis of lipoma cells *in vitro*, we tested other inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway. An overview is given in Table 1. The mTORC-1/-2 inhibitors WYE-354 (9) and KU-0063794 (10) suppressed lipoma cell viability by  $76.1 \pm 1.8$  and  $75.8 \pm 0.1\%$ , respectively, but did not induce apoptosis. The combined mTORC1/2 and PI3K inhibitor NVP-BEZ235 (11) showed similar effects. In contrast, apoptosis was induced by the PI3K inhibitor LY294002 by  $74.2 \pm 5.2\%$ . Perifosine, an AKT inhibitor, decreased viability almost completely by  $96.4 \pm 0.6\%$  and increased the number of apoptotic lipoma cells by  $84.5 \pm 0.9\%$  (Figure 3d).

#### DISCUSSION

The clinical management of PHTS is restricted to genetic counseling, surveillance for malignancies, and surgical interventions (12,13). A causal pharmacological therapy could be based on functional compensation of the dysregulated PTEN/AKT/mTOR signaling pathway. Two successful attempts of oral treatment with the mTORC-1 inhibitor sirolimus for patients with *PTEN* mutations have been reported (5,6). The treatment attempt described here was the first PHTS case in which lipoma adipocytes were the focus of treatment, whereas other cell types, e.g., endothelial cells, were targeted in other patients (6). Under sirolimus therapy, the growth of the patient's abdominal lipomatosis was attenuated, but the tumor volume was not reduced. These findings are in line with another case of successful sirolimus treatment for a child with a *PTEN* mutation, in which no changes in fatty tumor masses or subcutaneous adipose tissue were reported (5). We do not have clear evidence that sirolimus treatment did affect the patient's lipomatosis because the lipomatosis did not increase in size again after cessation of the sirolimus treatment. The attenuation of lipoma growth could have been simply an expression for the tragic state of cachexia in the patient, inhibiting further growth



**Figure 3.** Inhibitor effects on proliferation, adipocyte differentiation, and apoptosis *in vitro*. **(a)** Cell viability was decreased by  $42.5 \pm 3.7\%$  (mean  $\pm$  SEM) by sirolimus (100 nmol/l). Analogues showed lower effects at equimolar concentrations. Data of three independent experiments normalized to 0 nmol/l values are presented. Solvent (0.1% dimethylsulfoxide)-treated cells did not differ from cells in culture medium. (Triangle, temsirolimus; diamond, everolimus; circle, sirolimus). **(b)** Sirolimus (100 nmol/l) repressed differentiation of lipoma cells into mature adipocytes by  $56.4 \pm 9.1\%$  (mean  $\pm$  SEM;  $P < 0.01$ ). One representative out of three independent experiments is shown. **(c)** Sirolimus and analogues did not induce apoptosis at inhibitor concentrations of 100 nmol/l. Geneticin (G418) served as positive control and solvent (dimethylsulfoxide 0.1%) as negative control. Two independent experiments are shown. **(d)** The annexinV–fluorescein isothiocyanate/propidium iodide flow cytometry analysis revealed an increase in apoptotic lipoma cells by  $84.5 \pm 0.9\%$  after 72 h of perifosine treatment. Three independent experiments performed in duplicates are shown. **(e)** The phosphorylation of p70S6K after stimulation with insulin-like growth factor (IGF)-I was inhibited by sirolimus at concentrations of 10 and 100 nmol/l. The decreased phosphorylation of insulin receptor substrate 1 (IRS1) and the concomitant stronger AKT activation might reflect the loss of the negative feedback loop of p70S6K via insulin receptor substrate 1 under sirolimus treatment. One representative out of three independent experiments is shown.  $^{**}P < 0.001$ . NC, negative control; PC, positive control.

of the lipomas. In contrast, the decrease of the thymus volume under sirolimus therapy and the regrowth after cessation of treatment indicate convincingly a beneficial effect of sirolimus

for the patient. The recurrence of the hyperplastic thymus after 19 mo of sirolimus therapy might be due to an acquired resistance, as has been reported before for patients treated



**Table 1.** Effects of inhibitors on proliferation and apoptosis of lipoma cells in culture

Drug (concentration of maximum inhibition)	Target	Maximum inhibition of viability (%)	Change in apoptotic cells (%)	Human trials
		(mean $\pm$ SEM)	(mean $\pm$ SEM)	
Sirolimus (100 nmol/l)	mTORC-1	42.50 $\pm$ 3.67**	No	Approved
Everolimus (10 nmol/l)	mTORC-1	30.71 $\pm$ 2.55**	No	Approved
Temsirolimus (100 nmol/l)	mTORC-1	25.82 $\pm$ 4.88*	No	Approved
WYE-354 (5 $\mu$ mol/l)	mTORC-1 + 2	76.10 $\pm$ 1.83**	No	Preclinical (25)
KU-0063794 (5 $\mu$ mol/l)	mTORC-1 + 2	75.80 $\pm$ 0.06**	No	Preclinical (25)
Wortmannin (100 $\mu$ mol/l)	PI3K	40.89 $\pm$ 3.24**	No	—
LY294002 (500 $\mu$ mol/l)	PI3K	98.09 $\pm$ 0.70**	74.22 $\pm$ 5.21**	—
NVP-BEZ235 (10 $\mu$ mol/l)	PI3K, mTORC-1 + 2	82.12 $\pm$ 4.12**	No	Phase I/II (26)
Perifosine (100 $\mu$ mol/l)	AKT	96.40 $\pm$ 0.60**	84.52 $\pm$ 0.90**	Phase III (27)

The presented data show the effects of inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathways on proliferation and apoptosis of the lipoma cell strain *in vitro*. Data of three independent experiments (WST-1 assays) in triplicates are shown. Apoptotic effects were assessed for the agents with a significant antiproliferative effect in three independent experiments in duplicates.

mTORC, mammalian target of rapamycin complex; PI3K, phosphoinositide-3-kinase.

\* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.001$ .

with sirolimus analogues (14). Different mechanisms, such as hyperactivation of the AKT (14) or of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (15) could be responsible for the potential resistance.

Marsh *et al.* (5) reported decreased IGFBP-2 serum levels under sirolimus therapy of a patient with PHTS and reevaluation during cessation of therapy for 12 wk. We suspect the high IGFBP-2 levels in our patient to be an indicator of the severe state of cachexia or the decreased PTEN activity, as proposed elsewhere (16), rather than being a disease marker. Lowered leptin serum levels, as seen in our patient, might be a more relevant marker for therapy success in patients with PHTS presenting with fat-containing tumors.

When studying the effects of sirolimus *in vitro* in preadipocytes derived from a lipoma of the patient, we found a significant decrease of viability and terminal adipose differentiation under sirolimus treatment *in vitro* already at concentrations (10 nmol/l) comparable with therapeutic serum levels of the patient. In contrast with our results, other groups reported apoptotic effects of sirolimus on tumor cells with deficient p53 or p21 function (17) or at micromolar concentrations (18). Analysis of pathway activation after treatment with sirolimus revealed an attenuated activation of the mTORC-1 target p70S6K, which is in line with the observed antiproliferative effect of sirolimus on the lipoma cells. Interestingly, after 48-h treatment with sirolimus, we found decreased IRS1 serine phosphorylation and a concomitantly increased AKT phosphorylation. This AKT hyperactivation (14) could be a possible mechanistic explanation for the sirolimus resistance observed in our patient. We have to acknowledge that a limitation of our *in vitro* studies is the lack of age- and sex-matched healthy control preadipocytes to estimate the effect of the inhibitors on normal adipose tissues.

We screened additional inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway (Table 1) to identify putative pharmacological targets for the efficient induction of apoptosis in lipoma cells. Although long-term incubation with sirolimus was shown

to exert inhibitory effects on mTORC-2 also (19), treatment with mTORC-1/-2 inhibitors led to a stronger decrease in the viability of lipoma cells. The observed proapoptotic effects of perifosine (AKT inhibitor) and LY294002 (PI3K inhibitor) on lipoma cells could be mediated by a negative regulation of the Forkhead transcription factor Foxo1 on phosphorylation by AKT (20). Inhibition of PI3K/AKT might represent a future treatment option for lipomatosis linked with defects in the *PTEN* gene. Limited potentially beneficial effects of perifosine treatment for colorectal cancer and multiple myeloma were reported (21). Nevertheless, grades 3–4 adverse effects (e.g., anemia, hand-foot syndrome, or pulmonary embolism) (21,22) limit the clinical applicability of perifosine.

## METHODS

### Consent and Ethics

Written informed consent of the parents was obtained for the culture of lipoma cells, collection, and presentation of clinical data as well as for sirolimus treatment. Ethics consent for sirolimus treatment was obtained from the internal review board of the Leipzig University Hospital.

### Genotyping

DNA was extracted using the FlexiGene DNA isolation kit (Qiagen, Hilden, Germany). Exons and flanking regions of *PTEN* (GenBank: NT\_030059; NM\_000314.4) were amplified by polymerase chain reaction and analyzed by direct DNA sequencing with the Mutation Surveyor V3.97 (SoftgeneticsLLC, State College, PA). To detect deletions/duplications of exons of *PTEN*, multiplex ligation-dependent probe amplification screening was performed (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). Break point analysis was performed using a custom-designed array-based comparative genomic hybridization of chromosome 10 (Source Bioscience, NimbleGen platform, Nottingham, UK). Further details of the method will be given on request.

### MRI Reconstruction

MRI data (sequence = T1-turbo-spin-echo, echo time (TE) = 9.5 ms, repetition time (TR) = 670 ms, device: 3 tesla; Siemens, Erlangen, Germany) were assessed using the open source software Osirix-DICOM viewer (<http://www.osirix-viewer.com/Contact.html>). We used two-dimensional-growing brush regions of interest for



segmentation of the tumor volumes (23). Volumes were segmented twice by two observers and presented as means  $\pm$  SDs. The volume rendering of the MRI analysis differed slightly from routine measurements reported earlier (7).

#### Primary Cell Culture

Lipomas from the lumbar skin and retroperitoneal space were resected for diagnostic purposes. Remaining tissue was used to establish an adherent preadipocyte culture. A detailed protocol is given in the **Supplementary Data** online.

#### Adipose Differentiation

Lipoma cells were differentiated following adapted protocols (24). Sirolimus was added at the indicated concentrations. To determine the percentage of lipid-accumulating cells, triglycerides were stained with Nile red and Hoechst-33342 (both reagents from Sigma, Munich, Germany) counterstaining visualized the nuclei. Five defined, randomly chosen areas per well were counted using fluorescence microscopy. A detailed protocol is given in the **Supplementary Data** online.

#### Western Blots

To investigate the effect of sirolimus on the activity of mTORC-1 *in vitro*, lipoma cells were incubated with sirolimus for 48 h and subsequently stimulated with recombinant human IGF-I (Pharmacia, Uppsala, Sweden) for 15 min. After lysis, electrophoretic separation of proteins, and blotting onto nitrocellulose membranes, immunoblotting was performed to detect the amount of phosphorylated p70S6K(Thr421/Ser424), IRS1(Ser636/639), and AKT(Thr308; Ser473; all from NEB, Ipswich, MA) using standard protocols.

#### Cell Proliferation

The effects of the inhibitors on cell proliferation were estimated using the WST-1 assay (Roche, Mannheim, Germany) following the manufacturer's instructions. Cells were seeded at a density of 10,000 cells/cm<sup>2</sup> and incubated for 72 or 96 h with different inhibitor concentrations. The following inhibitors were used: sirolimus, everolimus, temsirolimus, wortmannin, NVP-BEZ235 (LCLaboratories, Woburn, MA), perifosine, LY294002 (Selleckchem, Munich, Germany), WYE-354, and KU-0063794 (Chemdea, Rigdenwood, NJ). Absorbance was measured at 450 nm.

#### Induction of Apoptosis and Cell Death

Apoptosis was determined by annexinV-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide (BD, Franklin Lakes, NJ) staining. Cells were seeded at a density of 5,000 cells/cm<sup>2</sup> in 35-mm dishes. After 24 h, cells were treated with inhibitors for 72 h. Media were changed every day. Cells were trypsinized and incubated with annexinV-fluorescein isothiocyanate and propidium iodide for 10 min at 4 °C in the dark. AnnexinV-positive and AnnexinV/propidium iodide-double positive cells were considered apoptotic/dead.

#### Measurement of IGFBP-2, IGFBP-3, Leptin, and Adiponectin

Serum levels of IGFBP-2, IGFBP-3, leptin, and adiponectin were determined using the IGFBP-2 enzyme immunoassay, IGFBP-3 enzyme-linked immunosorbent assay, the sensitive leptin enzyme-linked immunosorbent assay, and the adiponectin enzyme immunoassay (Mediagnost, Reutlingen, Germany) according to manufacturer's instructions. Age or age- and BMI-dependent reference intervals were transferred from manufacturer's data.

#### Statistics

Statistical analysis of data was performed with GraphPad Prism 5.4 software (GraphPad Software, La Jolla, CA) by applying one-way ANOVA, followed by Bonferroni's multiple comparison test. Significant differences are designated as \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.001$ .

#### SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/pr>

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the family of the reported patient for supporting our work and to his physicians and the nurses who help to care for the patient in the

hospital and outpatient clinics. We also thank our technical assistants Antje Berthold, Roy Tauscher, Anja Barnikol-Oettler, and Sandy Laue for excellent work, Lars-Christian Horn for advice on histology, and our colleagues from the Center for Pediatric Research for helpful discussions.

#### STATEMENT OF FINANCIAL SUPPORT

The project was supported by the Federal Ministry of Education and Research, Germany, FKZ: 01EO1001, the German Research Council (KFO152), the German Diabetes Society, and LIFE–Leipzig Research Center for Civilization Diseases, University of Leipzig. LIFE is funded by the European Union, the European Regional Development Fund, and the Free State of Saxony within the framework of the excellence initiative.

Disclosure: The authors confirm that there are no financial ties to products in the study or other conflicts of interest.

#### REFERENCES

- Eng C. PTEN: one gene, many syndromes. *Hum Mutat* 2003;22:183–98.
- Nelen MR, Kremer H, Konings IB, et al. Novel PTEN mutations in patients with Cowden disease: absence of clear genotype-phenotype correlations. *Eur J Hum Genet* 1999;7:267–73.
- Tan MH, Mester JL, Ngeow J, Rybicki LA, Orloff MS, Eng C. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clin Cancer Res* 2012;18:400–7.
- Bubien V, Bonnet F, Brouste V, et al.; French Cowden Disease Network. High cumulative risks of cancer in patients with PTEN hamartoma tumour syndrome. *J Med Genet* 2013;50:255–63.
- Marsh DJ, Trahair TN, Martin JL, et al. Rapamycin treatment for a child with germline PTEN mutation. *Nat Clin Pract Oncol* 2008;5:357–61.
- Iacobas I, Burrows PE, Adams DM, Sutton VR, Hollier LH, Chintagumpala MM. Oral rapamycin in the treatment of patients with hamartoma syndromes and PTEN mutation. *Pediatr Blood Cancer* 2011;57:321–3.
- Heindl M, Händel N, Ngeow J, et al. Autoimmunity, intestinal lymphoid hyperplasia, and defects in mucosal B-cell homeostasis in patients with PTEN hamartoma tumor syndrome. *Gastroenterology* 2012;142:1093–1096.e6.
- Tremblay F, Gagnon A, Veilleux A, Sorisky A, Marette A. Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes. *Endocrinology* 2005;146:1328–37.
- Yu K, Toral-Barza L, Shi C, et al. Biochemical, cellular, and *in vivo* activity of novel ATP-competitive and selective inhibitors of the mammalian target of rapamycin. *Cancer Res* 2009;69:6232–40.
- Garcia-Martinez JM, Moran J, Clarke RG, et al. Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochem J* 2009;421:29–42.
- Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, et al. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent *in vivo* antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1851–63.
- Blumenthal GM, Dennis PA. PTEN hamartoma tumor syndromes. *Eur J Hum Genet* 2008;16:1289–300.
- Lopiccolo J, Ballas MS, Dennis PA. PTEN hamartomatous tumor syndromes (PHTS): rare syndromes with great relevance to common cancers and targeted drug development. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;63:203–14.
- O'Reilly KE, Rojo F, She QB, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 2006;66:1500–8.
- Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* 2008;118:3065–74.
- Mehrian-Shai R, Chen CD, Shi T, et al. Insulin growth factor-binding protein 2 is a candidate biomarker for PTEN status and PI3K/Akt pathway activation in glioblastoma and prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:5563–8.
- Huang S, Liu LN, Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Houghton PJ. p53/p21(CIP1) cooperate in enforcing rapamycin-induced G(1) arrest and determine the cellular response to rapamycin. *Cancer Res* 2001;61:3373–81.

18. Yellen P, Saqcena M, Salloum D, et al. High-dose rapamycin induces apoptosis in human cancer cells by dissociating mTOR complex 1 and suppressing phosphorylation of 4E-BP1. *Cell Cycle* 2011;10:3948–56.
19. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006;22:159–68.
20. Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:11285–90.
21. Richardson PG, Eng C, Kolesar J, Hideshima T, Anderson KC. Perifosine, an oral, anti-cancer agent and inhibitor of the Akt pathway: mechanistic actions, pharmacodynamics, pharmacokinetics, and clinical activity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012;8:623–33.
22. Cho DC, Hutson TE, Samlowski W, et al. Two phase 2 trials of the novel Akt inhibitor perifosine in patients with advanced renal cell carcinoma after progression on vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Cancer* 2012;118:6055–62.
23. Rosset A, Spadola L, Ratib O. OsiriX: an open-source software for navigating in multidimensional DICOM images. *J Digit Imaging* 2004;17:205–16.
24. Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, et al. Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:8–15.
25. Vilar E, Perez-Garcia J, Tabernero J. Pushing the envelope in the mTOR pathway: the second generation of inhibitors. *Mol Cancer Ther* 2011;10:395–403.
26. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Novartis. A Phase 1b/2 Study of BEZ235 in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma (RCC), 2013. (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01453595>).
27. Aeterna Zentaris, Sarah Cannon Research Institute. A Phase III Randomized Study to Assess the Efficacy and Safety of Perifosine Plus Capecitabine Versus Placebo Plus Capecitabine in Patients with Refractory Advanced Colorectal Cancer, 2013. (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01097018>).

# ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades *doctor medicinae* (Dr. med.)

## Sirolimusbehandlung eines Kindes mit PTEN-Hamartom-Tumor-Syndrom

– Ein Fallbericht und in vitro Studien –

Eingereicht von: Gordian Lukas Schmid  
Angefertigt an: Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Medizinische Fakultät, Universität Leipzig  
Betreut von: Herrn Prof. Dr. med. Wieland Kiess  
Frau Dr. rer. nat. Antje Garten  
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Medizinische Fakultät, Universität Leipzig  
Eingereicht im: April 2015

### Hintergrund

Das *Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10* (PTEN)-Protein reguliert als wichtiges Enzym in der *Phosphoinositid-3-Kinase* (PI3K)/ AKT / *mammalian target of rapamycin* (mTOR)-Signalkaskade unter anderem die Proliferation, Adhäsion, Migration, das Überleben und die Angiogenese in verschiedenen Zelltypen und wirkt weiterhin als Tumorsuppressor. Somatische Mutationen im *PTEN*-Gen konnten in vielen sporadischen Tumoren nachgewiesen werden. Außerdem ist eine Gruppe hereditärer Erkrankungen mit heterozygoten Keimbahnmutationen im *PTEN*-Gen bekannt. Diese Gruppe, bestehend aus dem Cowden-Syndrom, dem Bannayan-Riley-Ruvalcaba-Syndrom, dem Proteus-Syndrom und dem Proteus-like-Syndrom, wird als PTEN-Hamartom-Tumor-Syndrom (PHTS) zusammengefasst (10–12). Typisch für das PHTS sind die namensgebenden Hamartome, Makrozephalie, Gefäßmalformationen, Naevi, asymmetrischer Überwuchs, Lipomatosen und Trichilemmome (16). Außerdem leiden die Patienten unter dem deutlich erhöhten Risiko für Brust-, Schilddrüsen-, Endometrium-, Nieren- und kolorektale Karzinome, sowie für maligne Melanome (17). Derzeitig besteht die Therapie dieser Syndrome nur aus engmaschiger Überwachung von Neoplasien, genetischer Beratung und symptomatischen chirurgischen Eingriffen (20). Als kausaler Therapieansatz wurde Sirolimus, auch als Rapamycin bekannt, vorgeschlagen. Dieses aus der Transplantationsmedizin bekannte und erprobte Medikament

inhibiert den mTORC-1 und vermindert somit die Wirkung des überaktivierten PI3K/AKT-Signalweges in der Zelle. Erste publizierte Therapieversuche mit Sirolimus zeigten sowohl eine Abnahme von Tumervolumina (15) als auch einen günstigen Einfluss auf vaskuläre Malformationen (30) bei Patienten mit PHTS.

Ausgangspunkt dieses Projektes war ein dreijähriges Kind mit massiver Lipomatose des Abdomens, lymphatischer Hyperplasie des Thymus und der Darmschleimhaut, sowie mit Kachexie und Gedeihstörung. Es konnte bei dem Jungen eine heterozygote Keimbahndeletion im *PTEN*-Gen nachgewiesen werden. Beginnend im Alter von 46 Monaten wurde ein individueller Therapieversuch mit Sirolimus durchgeführt. Zu diagnostischen Zwecken wurde vor Therapiebeginn Lipom-Gewebe entfernt, aus dem eine primäre PTEN-defiziente Zellkultur angelegt werden konnte (im Folgenden als LipPD1 bezeichnet).

### **Fragestellung**

1. Kann Sirolimus die Symptome des Patienten mit PHTS verbessern und das Volumen der Lipomatose und der Thymushyperplasie verringern?
2. Kann Sirolimus in Lipom-Zellen die Proliferation und die adipozytäre Differenzierung hemmen und Apoptose induzieren?
3. Welchen Einfluss auf Proliferation und Apoptose zeigen andere Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR Signalweges?
4. Ist der IGFBP-2 Serumspiegel ein geeigneter Biomarker für die Erfolgskontrolle einer Sirolimustherapie bei PHTS?

### **Ergebnisse**

Die orale tägliche Sirolimusgabe von 0,1mg/kg Körpergewicht wurde ohne Nebenwirkungen toleriert. Bereits nach 4 Wochen berichteten die Eltern des Patienten eine subjektive Verbesserung des Allgemeinbefindens. Nach einem Jahr Therapie konnte der Patient freihändig laufen und besuchte einen Kindergarten. Nach dem kompletten Wachstumsstillstand vor der Therapie wurde ein transientes Aufholwachstum von 4,8 cm (+0,57 SDS) innerhalb der ersten vier Monate der Behandlung beobachtet, welches im Folgenden jedoch wieder abflachte. Das Gewicht des Patienten nahm über den gesamten Beobachtungszeitraum nur um 0,75 kg zu. Auch die vollständige Abwesenheit von subkutanem Fettgewebe veränderte sich nicht.

Das Thymusvolumen verkleinerte sich in den ersten 4 Monaten der Behandlung von 246 cm<sup>3</sup> auf 99 cm<sup>3</sup>. Nach 19 Monaten zeigte sich ein erneutes Wachstum des Thymus auf 273 cm<sup>3</sup>.

Das Wachstum der abdominellen Lipomatose zeigte sich verlangsamt beim Vergleich des Zeitraumes vier Monate vor und nach Beginn der Therapie (von 1901 cm<sup>3</sup> auf 2311 cm<sup>3</sup>;  $\Delta$ 410 cm<sup>3</sup>) mit den letzten 15 Monaten der Sirolimusbehandlung (von 2311 cm<sup>3</sup> auf 2471 cm<sup>3</sup>;  $\Delta$ 160 cm<sup>3</sup>). Nach 19 Monaten wurde die Sirolimusbehandlung abgebrochen, da der klinische Nutzen bei erneutem Thymuswachstum fragwürdig erschien. In den darauffolgenden 8 Monaten vergrößerte sich der Thymus weiter (auf 376 cm<sup>3</sup>), während die abdominelle Lipomatose kein Größenwachstum mehr zeigte.

Die Serumspiegel des IGFBP-2 waren im beobachteten Zeitraum sowohl vor als auch während der Therapie deutlich erhöht und schwankten sehr stark. Es gab keinen signifikanten Unterschied der Werte vor und während der Behandlung.

Die *in vitro* Versuche zeigten, dass Sirolimus (100 nmol/l für 96h) die Viabilität als Maß für die Proliferation der Präadipozyten um  $42,5 \pm 3,7$  % reduzierte. Auch die adipozytäre Differenzierung der LipPD1-Zellen war um  $56,4 \pm 9,1$  % vermindert bei einer Sirolimus-Konzentration von 100 nmol/l. Es gab keinen Hinweis für eine Apoptose-induzierende Wirkung von Sirolimus auf die LipPD1-Zellkulturen. Unter den weiteren getesteten Inhibitoren zeigte vor allem der AKT-Inhibitor Perifosin eine starke Wachstumsverminderung und Induktion der Apoptose und könnte damit als potenzielles Pharmakon für die Behandlung von Erkrankungen mit Störungen des PI3K/AKT/mTOR Signalweges nützlich werden.

Die Analysen des PI3K/AKT/mTOR Signalweges mittels Westernblots ergaben zum einen eine verminderte PTEN-Proteinmenge und eine konstitutive Phosphorylierung, also Aktivierung der AKT in den LipPD1-Zellen im Vergleich zu dem humanen Präadipozytenmodell SGBS. Zum anderen zeigte sich nach 48 h Sirolimusbehandlung eine verminderte Phosphorylierung der S6-Kinase, eines Effektormoleküls des mTORC1, bei Stimulation mit IGF-1. Gleichzeitig war das Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS1) weniger phosphoryliert, somit aktiviert, und die AKT stärker phosphoryliert, also aktiviert. Dies könnte auf eine durch Sirolimus verminderte Feedback-Hemmung des mTORC1 über die S6-Kinase und das IRS1 hindeuten. Dieser Feedback-Mechanismus wurde bereits bei Patienten beobachtet, die aufgrund einer Tumorerkrankung an einer Sirolimustherapiestudie teilnahmen (38).

### **Schlussfolgerung**

Unter Sirolimustherapie zeigten sich eine Verbesserung des Allgemeinbefindens des Patienten, ein Aufholwachstum und eine transiente Reduktion des Thymusvolumens. Die Lipomatose zeigte sich unter Sirolimustherapie in ihrem Wachstum verlangsamt, nahm jedoch auch nach Absetzen der Medikation nicht an Größe zu. Dies lässt an einem ursächlichen Zusammenhang zwischen Wachstum der Lipomatose und der Sirolimustherapie zweifeln. Das



erneute Wachstum des Thymus nach 19 Monaten Sirolimusgabe deutet auf die Entstehung einer Resistenz hin. Westernblot Analysen gaben einen Hinweis für einen möglichen Resistenzmechanismus.

Der IGFBP-2 Serumspiegel des Patienten war vor und während der Therapie hoch variabel und nicht als Biomarker für den Erfolg der Sirolimustherapie geeignet.

*In vitro* führte Sirolimus zu einer deutlichen Hemmung der Proliferation und Differenzierung der LipPD1-Zellen. Die Apoptose konnte hingegen nicht induziert werden. Bei der Testung der weiteren Inhibitoren traten vor allem Inhibitoren von PI3K und AKT als potenzielle Pharmaka für Patienten mit schwerem PHTS hervor.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Bradshaw RA; Dennis EA: **Handbook of cell signaling. Available from:**  
<http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123741455/>  
<http://www.gbv.eblib.com/patron/FullRecord.aspx?p=631909>.
2. Vilar E, Perez-Garcia J, Tabernero J: **Pushing the envelope in the mTOR pathway: the second generation of inhibitors.** *Mol. Cancer Ther.* 2011, **3**:395–403.
3. Rosner M, Hanneder M, Siegel N, Valli A, Fuchs C, Hengstschläger M: **The mTOR pathway and its role in human genetic diseases.** *Mutat. Res.*, **3**:284–92.
4. Hollander MC, Blumenthal GM, Dennis PA: **PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models.** *Nat. Rev. Cancer* 2011, **4**:289–301.
5. Karar J, Maity A: **PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis.** *Front Mol Neurosci* 2011:51.
6. Yin Y, Shen WH: **PTEN: a new guardian of the genome.** *Oncogene* 2008, **41**:5443–53.
7. Simpson L, Parsons R: **PTEN: life as a tumor suppressor.** *Exp. Cell Res.* 2001, **1**:29–41.
8. Leslie NR, Downes CP: **PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it.** *Biochem. J.* 2004, **Pt 1**:1–11.
9. Stambolic V, Suzuki A, La Pompa JL de, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW: **Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN.** *Cell* 1998, **1**:29–39.
10. Marsh DJ, Kum JB, Lunetta KL, Bennett MJ, Gorlin RJ, Ahmed SF, Bodurtha J, Crowe C, Curtis MA, Dasouki M, Dunn T, Feit H, Geraghty MT, Graham JM, Hodgson SV, Hunter A, Korf BR, Manchester D, Miesfeldt S, Murday VA, Nathanson KL, Parisi M, Pober B, Romano C, Eng C: **PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome.** *Hum. Mol. Genet.* 1999, **8**:1461–72.
11. Eng C: **Will the real Cowden syndrome please stand up: revised diagnostic criteria.** *J. Med. Genet.* 2000, **11**:828–30.
12. Merks JHM, Vries LS de, Zhou X, Nikkels P, Barth PG, Eng C, Hennekam RCM: **PTEN hamartoma tumour syndrome: variability of an entity.** *J. Med. Genet.* 2003, **10**:e111.
13. Perriard J, Saurat JH, Harms M: **An overlap of Cowden's disease and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome in the same family.** *J. Am. Acad. Dermatol.* 2000, **2 Pt 2**:348–50.
14. Biesecker LG, Happle R, Mulliken JB, Weksberg R, Graham JM, Viljoen DL, Cohen MM: **Proteus syndrome: diagnostic criteria, differential diagnosis, and patient evaluation.** *Am. J. Med. Genet.* 1999, **5**:389–95.
15. Marsh DJ, Trahair TN, Martin JL, Chee WY, Walker J, Kirk EP, Baxter RC, Marshall GM: **Rapamycin treatment for a child with germline PTEN mutation.** *Nat Clin Pract Oncol* 2008, **6**:357–61.
16. Eng C: **PTEN: one gene, many syndromes.** *Hum. Mutat.* 2003, **3**:183–98.

17. Tan M, Mester JL, Ngeow J, Rybicki LA, Orloff MS, Eng C: **Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations.** *Clin. Cancer Res.* 2012, **2**:400–7.
18. Nelen MR, Kremer H, Konings IB, Schoute F, van Essen AJ, Koch R, Woods CG, Fryns JP, Hamel B, Hoefsloot LH, Peeters EA, Padberg GW: **Novel PTEN mutations in patients with Cowden disease: absence of clear genotype-phenotype correlations.** *Eur. J. Hum. Genet.* 1999, **3**:267–73.
19. European Commission H&CPDCHaRACi: **Useful Information on Rare Diseases From an EU Perspective.** In: **ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000-[cited 2013 Feb 6].** Available from: [http://ec.europa.eu/health/ph\\_information/documents/ev20040705\\_rd05\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_information/documents/ev20040705_rd05_en.pdf).
20. Hobert JA, Eng C: **PTEN hamartoma tumor syndrome: an overview.** *Genet. Med.* 2009, **10**:687–94.
21. Bell A, Grunder L, Sorisky A: **Rapamycin inhibits human adipocyte differentiation in primary culture.** *Obes. Res.* 2000, **3**:249–54.
22. Laplante M, Sabatini DM: **mTOR signaling in growth control and disease.** *Cell* 2012, **2**:274–93.
23. Darling TN: **Hitting the mark in hamartoma syndromes.** *Adv Dermatol* 2006:181–200.
24. Franz DN, Leonard J, Tudor C, Chuck G, Care M, Sethuraman G, Dinopoulos A, Thomas G, Crone KR: **Rapamycin causes regression of astrocytomas in tuberous sclerosis complex.** *Ann. Neurol.* 2006, **3**:490–8.
25. Krueger DA, Care MM, Holland K, Agricola K, Tudor C, Mangeshkar P, Wilson KA, Byars A, Sahmoud T, Franz DN: **Everolimus for subependymal giant-cell astrocytomas in tuberous sclerosis.** *N. Engl. J. Med.* 2010, **19**:1801–11.
26. Birca A, Mercier C, Major P: **Rapamycin as an alternative to surgical treatment of subependymal giant cell astrocytomas in a patient with tuberous sclerosis complex.** *J Neurosurg Pediatr* 2010, **4**:381–4.
27. Bissler JJ, McCormack FX, Young LR, Elwing JM, Chuck G, Leonard JM, Schmithorst VJ, Laor T, Brody AS, Bean J, Salisbury S, Franz DN: **Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangioleiomyomatosis.** *N. Engl. J. Med.* 2008, **2**:140–51.
28. Cabrera-López C, Martí T, Catalá V, Torres F, Mateu S, Ballarín J, Torra R: **Assessing the effectiveness of rapamycin on angiomyolipoma in tuberous sclerosis: a two years trial.** *Orphanet J Rare Dis* 2012:87.
29. Foster RS, Bint LJ, Halbert AR: **Topical 0.1% rapamycin for angiofibromas in paediatric patients with tuberous sclerosis: A pilot study of four patients.** *Australas. J. Dermatol.* 2012, **1**:52–6.
30. Iacobas I, Burrows PE, Adams DM, Sutton VR, Hollier LH, Chintagumpala MM: **Oral rapamycin in the treatment of patients with hamartoma syndromes and PTEN mutation.** *Pediatr Blood Cancer* 2011, **2**:321–3.
31. Heindl M, Händel N, Ngeow J, Kionke J, Wittekind C, Kamprad M, Rensing-Ehl A, Ehl S, Reifenberger J, Loddenkemper C, Maul J, Hoffmeister A, Aretz S, Kiess W, Eng C, Uhlig HH: **Autoimmunity, intestinal lymphoid hyperplasia, and defects in mucosal B-cell homeostasis in patients with PTEN hamartoma tumor syndrome.** *Gastroenterology* 2012, **5**:1093-1096.e6.

32. Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Möller P, Heinze E, Debatin KM, Hauner H: **Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation.** *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2001, **1**:8–15.
33. Sabin MA, Russo VC, Azar WJ, Yau SW, Kiess W, Werther GA: **IGFBP-2 at the interface of growth and metabolism--implications for childhood obesity.** *Pediatr Endocrinol Rev* 2011, **4**:382–93.
34. Wheatcroft SB, Kearney MT, Shah AM, Ezzat VA, Miell JR, Modo M, Williams SCR, Cawthorn WP, Medina-Gomez G, Vidal-Puig A, Sethi JK, Crossey PA: **IGF-binding protein-2 protects against the development of obesity and insulin resistance.** *Diabetes* 2007, **2**:285–94.
35. Crowe FL, Key TJ, Allen NE, Appleby PN, Overvad K, Grønbæk H, Tjønneland A, Halkjær J, Dossus L, Boeing H, Kröger J, Trichopoulou A, Zylis D, Trichopoulos D, Boutron-Ruault M, Lauzon-Guillain B de, Clavel-Chapelon F, Palli D, Berrino F, Panico S, Tumino R, Sacerdote C, Bueno-de-Mesquita HB, van Gils CH, Peeters PHM, Gram IT, Rodríguez L, Jakszyn P, Molina-Montes E, Navarro C, et al.: **A cross-sectional analysis of the associations between adult height, BMI and serum concentrations of IGF-I and IGFBP-1 -2 and -3 in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC).** *Ann. Hum. Biol.* 2011, **2**:194–202.
36. Vorwerk P, Mohnike K, Wex H, Röhl F, Zimmermann M, Blum WF, Mittler U: **Insulin-like growth factor binding protein-2 at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia and the prediction of relapse risk.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005, **5**:3022–7.
37. Hoefflich A, Reisinger R, Lahm H, Kiess W, Blum WF, Kolb HJ, Weber MM, Wolf E: **Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter?** *Cancer Res.* 2001, **24**:8601–10.
38. O'Reilly KE, Rojo F, She Q, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N: **mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt.** *Cancer Res.* 2006, **3**:1500–8.

## **ANLAGEN**

### **I. Ergänzungsunterlagen zur wissenschaftlichen Publikation**

#### **Supplement 1 - Additional methodological descriptions**

##### **Primary cell culture**

The tissue (~20 g) was chopped into 1 cm<sup>3</sup> pieces and washed twice with PBS. After digestion in 200 U/ml Collagenase-HBSS-solution for 90 min in a 37°C shaking water bath, the material was filtered through a nylon mesh (250 µm) and centrifuged at 1,100 rpm at 25°C for 5 min. The supernatant was decanted, the pellet washed and centrifuged at 1,500 rpm. Erythrocytes were eliminated by lysis and subsequent centrifugation at 1,500 rpm. Pellets were resuspended in culture medium (DMEM/F12, 10% fetal calf serum (FCS), biotin (33 µmol/l) and pantothenic acid (17 µmol/l)), filtered (50 µm) and seeded as adherent cultures.

##### **Adipocyte differentiation**

Cells were seeded at 10,000 cells/cm<sup>2</sup> in 6-well-plates. Differentiation was induced by serum free medium (DMEM/F12, biotin (33 µmol/l), panthotenic acid (17 µmol/l), apo-transferrin (0.13 nmol/l), insulin (20 nmol/l), hydrocortisone (100 nmol/l) and triiodothyronine (0.2 nmol/l). For the first four days, dexamethasone (25 nmol/l), 1-methyl-3-isobutylxanthine (500 µmol/l) and rosiglitazone (2 µmol/l) were added. The medium was changed every other day until day 12.

#### **Supplement 2 - Video clip of 3D-MRI reconstruction**

File name: Supplement-2-Video-clip.mov (QuickTime movie)

The video sequence shows a 3D-reconstruction of the MRI of the patient at the age of 42 months. The colored areas are the ROIs used for the volume quantification of the lipoma at the neck (red), the hyperplastic thymus (green) and the abdominal lipomatosis (blue). The video was generated using OsiriX®-DICOM viewer (32 bit) open source software. This video clip can be watched using the open source software “VLC-media player” available at <http://www.videolan.org/vlc/>

## II. Charakterisierung der Lipom-Zellkulturen

### II.a Lipom-Zellen in Langzeitkultur

Die PTEN-defizienten Lipomzellen (LipPD1) wurden bezüglich ihrer Verdopplungszeit und ihres Verhaltens in einer Langzeitkultur untersucht. Die Verdopplungszeit wurde mit einer Zeitkurve von Hoechst-Farbstoff-markierten und gezählten Zellkernen unter Zuhilfenahme des Rechenprogramms „Doubling time calculator“ (<http://www.doubling-time.com/compute.php>; Roth V. 2006) auf etwa 23h geschätzt. Die Langzeitkultur diente der Erfassung der Lebensspanne und des Differenzierungspotenzials der LipPD1-Präadipozyten zu reifen Fettzellen. Dabei wurden die Zellen in Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup> Fläche) ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Noch bevor die Zellen konfluent gewachsen waren, wurde die Kultur erneut passagiert und verdünnt neu ausgesät. Im Abstand von drei Passagen wurde in einem Teil der Zellkulturen die adipozytäre Differenzierung induziert. Der Grad der Differenzierung wurde, wie im Publikationsmanuskript beschrieben, mit Hilfe einer Fett- und einer Zellkernfärbung erfasst.

Die Lipom-Zellen ließen sich für über 80 Verdopplungen kultivieren. Danach verlangsamte sich die Wachstumsgeschwindigkeit und die Zellen starben ab. Die Differenzierungsrate entsprach nach 29 Verdopplungen immer noch 55.1 %. Wie in Abbildung 2 dargestellt, zeigte sich im Vergleich zu den von WABITSCH et al. publizierten Daten von Kontroll-Präadipozytenkulturen gesunder Kinder (32) eine stark verlängerte Überlebenszeit der Lipom-Zellen in Kultur und eine deutlich langsamere Abnahme des Differenzierungspotenzials über die Passagen hinweg. Als weitere Referenz diente uns außerdem das von WABITSCH et al. charakterisierte SGBS-(Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom)-Zellmodell (32).

Wegen der stark verlängerten Überlebenszeit im Vergleich zu Präadipozyten aus gesundem Fettgewebe und dem hohen Potenzial zur terminalen adipozytären Differenzierung, sind die Lipom-Zellen als Modell für weitere Untersuchungen zur Adipozytenbiologie und zur Erforschung des Einflusses einer heterozygoten *PTEN*-Deletion auf die Funktion von Präadipozyten geeignet. Eine immortale Zelllinie konnte jedoch nicht gewonnen werden. Dennoch stellt dieser Zellstamm eine außergewöhnliche Möglichkeit dar, die Pathomechanismen der Lipomentstehung beim oben genannten Patienten und die Wirkung von potenziellen Medikamenten *in vitro* parallel zur klinischen Betreuung des Patienten zu erforschen.

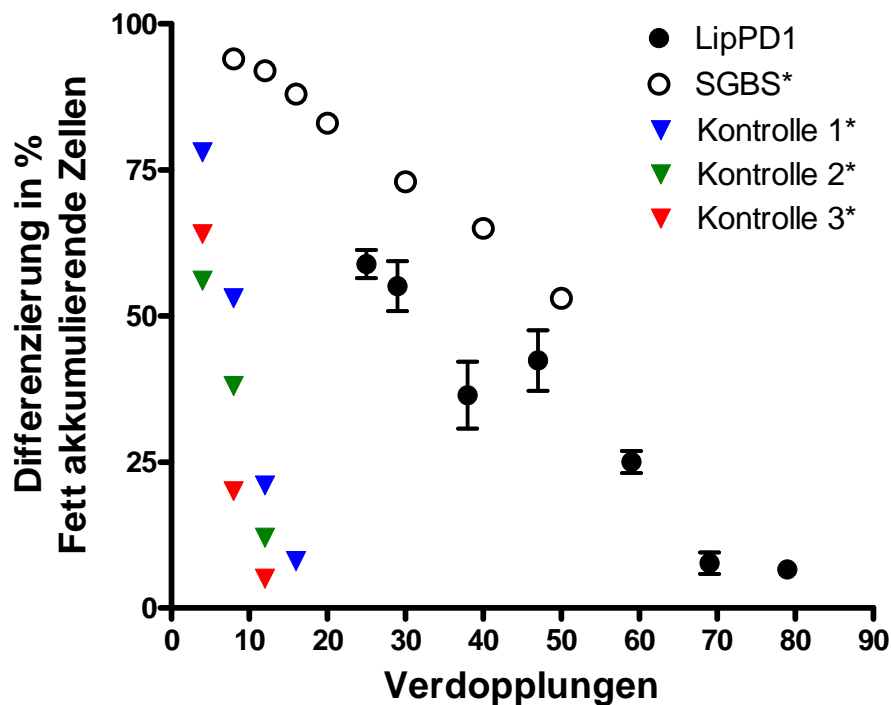


Abb. 2: Darstellung der Langzeitkultur der primären Lipom-Zellen

Langzeitkultur der LipPD1-Zellen im Vergleich zu SGBS-Zellen und altersangepassten Kontrollen.

\*Daten entnommen von WABITSCH et al. (2001) (32)

## II.b Veränderung im PI3K-Signalweg

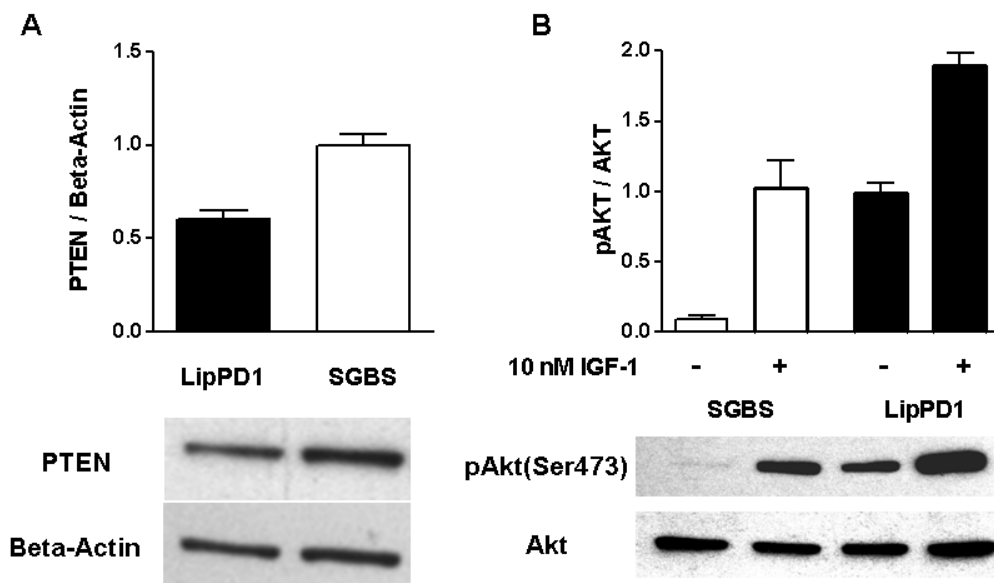
Um die Auswirkungen der *PTEN*-Deletion auf die Funktion der betroffenen Zellen zu untersuchen, wurde das oben genannte Lipom-Zellmodell verwendet. Die von Professor Martin Wabitsch (Universitätsklinikum Ulm, Sektion Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie) freundlicherweise zur Verfügung gestellten SGBS-Zellen dienten während der funktionellen Untersuchungen als Referenz für Präadipozyten ohne *PTEN*-Defekt.

Zunächst wurde mittels Westernblots die Menge des PTEN-Proteins in den Lipom-Zellen untersucht. Es zeigte sich eine signifikant erniedrigte PTEN-Proteinkonzentration im Vergleich zu den SGBS-Zellen (Abbildung 3A).

Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, ist bei funktionellem PTEN-Mangel in der Zelle eine erhöhte Phosphorylierung, also Überaktivierung der AKT zu erwarten. Westernblots vor und nach 15 min Stimulation mit IGF-1 (10 nM) zeigten sowohl eine konstitutive Hyperphosphorylierung der AKT in den Lipom-Zellen als auch eine erhöhte phospho-AKT-Menge nach Stimulation (Abbildung 3B) jeweils im Vergleich zu den SGBS-Zellen.

So konnte neben dem genetischen Mutationsnachweis außerdem gezeigt werden, dass die heterozygote *PTEN*-Deletion zu einem funktionellen PTEN-Mangel in den betroffenen

Lipom-Zellen führt und eine verstärkte Aktivierung der nachfolgenden Wachstumssignalkaskade, auch ohne adäquaten Stimulus, verursacht.



**Abb. 3: Veränderungen im PTEN/PI3K/AKT Signalweg**

(A) Die PTEN-Proteinmenge wurde in den LipPD1-Zellen im Vergleich zu SGBS-Zellen vermindert detektiert.  
 (B) Die Phosphorylierung der AKT zeigte sich in den LipPD1-Zellen konstitutiv erhöht. Nach Stimulation mit IGF-1 konnte dieser Effekt weiter verstärkt werden.



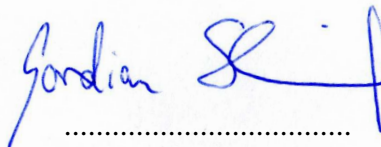
### III. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

26.11.2015

.....

Datum



.....

Unterschrift

## **IV. Danksagungen**

Ich danke besonders meinem Doktorvater Prof. Wieland Kiess für seine Betreuung und Unterstützung während meiner Promotion. Dank seiner Förderung und des kritischen Diskurses mit ihm war diese Zeit eine vielseitig prägende Etappe meines Studiums.

Für die warmherzige Aufnahme und die ständige praktische Hilfestellung im Forschungslabor danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Prof. Wieland Kiess und Prof. Antje Körner. Besonders zu nennen sind dabei Antje Berthold, Antje Garten und Susanne Schuster, die mit besonders viel Zeit und Nachsicht meine ersten experimentellen Arbeiten begleiteten. Als wichtiger Unterstützerin der experimentellen Arbeiten und deren Auswertung sei an dieser Stelle Franziska Käßner gedankt.

Des Weiteren gilt großer Dank allen Koautoren und Lektoren, die mir bei der Erstellung und Überarbeitung der wissenschaftlichen Publikation auch über lange Durststrecken hinweg immer wieder zur Seite standen.

Für die große Bereitschaft zum Austausch über die eigene Arbeitsgruppe hinaus danke ich vor allem den Forschergruppen von Prof. Peter Kovacs, Prof. Michael Schaefer, Prof. Matthias Blüher und Prof. Mathias Faßhauer der Universität Leipzig.

Für die finanzielle Förderung, ohne die die intensive Auseinandersetzung mit meiner Arbeit nicht möglich gewesen wäre, danke ich dem Integrierten Forschungs- und Behandlungszentrum (IFB) AdipositasErkrankungen, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig, der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) und LIFE – Leipziger Forschungszentrum für Zivilisationserkrankungen (LIFE wird finanziert aus Mitteln der Europäischen Union durch den Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) und aus Mitteln des Freistaates Sachsen im Rahmen der Landesexzellenzinitiative).

Nicht zuletzt seien hier auch meine treuen Freunde Anna Rau, Adrian Viehweger, Judit Richter, Anne Mahler und Doreen Wittkopf genannt, die mir während meiner Promotion stets neue Motivation schenkten und mir halfen, bei Misserfolgen den nötigen Abstand und Humor zu wahren.

Besonders möchte ich mich bei meiner Partnerin Veronika für die beständige Unterstützung und Liebe bedanken.